製品コード CY214

研究用

TaKaRa

Cycleave®PCR 呼吸器系感染症 起因菌検出キット Ver.2

説明書

Ver.2 より、製品内容が変更になりました。

v201401Da

市中感染症のうち、肺炎あるいは化膿性髄膜炎などは、原因菌を速やかに特定し、適切な抗菌薬を用いた治療が必要とされる疾患で、原因菌の種類によっては選択される抗菌薬が異なります。また、これらの感染症から分離される頻度の高い肺炎球菌やインフルエンザ菌、そしてマイコプラズマには、薬品耐性をもつものが増加してきています。

本キットは、北里大学北里生命科学研究所 生方公子教授監修の元、感染症の原因となる可能性の高い菌、重篤化しやすい菌、あるいは原因菌として特定するまでに長時間を要する菌を含めた 6 菌種－肺炎球菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマ、クラミドフィラ、レジオネラ菌、A 群レンサ球菌－を、リアルタイム PCR 装置を用いて検出するためのキットとして開発されました。

本キットの増幅には Hot Start PCR 用酵素、*TaKaRa Ex Taq*® HS を使用しているので、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

検出には、サイクリングプローブ法を採用しています。サイクリングプローブ法は、RNA と DNA からなるキメラプローブと RNase H の組み合わせによる高感度な検出方法で、増幅中や増幅後の遺伝子断片の特定配列を効率良く検出することが出来ます。プローブは片方の端が蛍光物質で、もう片方の端がその蛍光物質の発する蛍光を消光する物質（クエンチャー）で標識されています。このプローブは、インタクトな状態ではクエンチングにより蛍光を発することはありませんが、配列が相補的な増幅産物とハイブリッドを形成した後に RNase H により RNA 部分で切断されることにより、強い蛍光を発するようになります（図 1 参照）。この蛍光強度を測定することで、増幅産物量をリアルタイムにモニターすることができます。
核酸の増幅からリアルタイム検出までを同一のチューブ内で行うため、PCR 産物を確認するための電気泳動が不要で、迅速に結果を得ることができます。また、増幅産物による汚染、他のサンプルへのコンタミネーションの危険性を避けることができます。

Ver.2 では、各ターゲットの Positive Control が含まれており、より確実に判定を行うことが可能になりました。

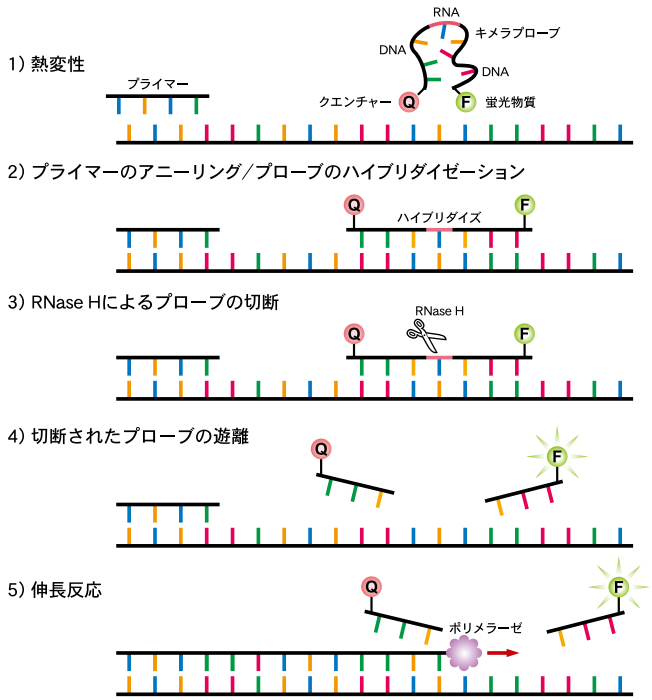


図 1．サイクリングプローブによる検出原理

I. キットの内容（25 μl 反応× 10 反応分× 6 種類）

1.	2 × CycleavePCR Reaction Mixture＊1	750 μl（60 反応分）
2.	Probe/Primer Mix - 1＊2	20 μl（10 反応分）
3.	Probe/Primer Mix - 2＊2	20 μl（10 反応分）
4.	Probe/Primer Mix - 3＊2	20 μl（10 反応分）
5.	Probe/Primer Mix - 4＊2	20 μl（10 反応分）
6.	Probe/Primer Mix - 5＊2	20 μl（10 反応分）
7.	Probe/Primer Mix - 6＊2	20 μl（10 反応分）
8.	dH_2O	750 μl
9.	Positive Control 1 - FAM	10 μl
10.	Positive Control 2 - FAM	10 μl
11.	Positive Control 3 - FAM	10 μl
12.	Positive Control 4 - FAM	10 μl
13.	Positive Control 5 - FAM	10 μl
14.	Positive Control 5 - ROX	10 μl
15.	Positive Control 6 - FAM	10 μl
16.	Positive Control 6 - ROX	10 μl

＊1： 反応に必要なバッファー、dNTP Mixture、酵素を含む。
融解させる際に vortex は使用しないこと。
＊2： 蛍光標識プローブが含まれているため、遮光に留意すること。

	ターゲット菌	FAM 検出遺伝子	ROX 検出遺伝子
Probe/Primer Mix - 1	肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae*	*LytA* 遺伝子	なし
Probe/Primer Mix - 2	インフルエンザ菌 *Haemophilus influenzae*	16S rRNA 遺伝子＊1	なし
Probe/Primer Mix - 3	マイコプラズマ・ニューモニエ *Mycoplasma pneumoniae*	16S rRNA 遺伝子	なし
Probe/Primer Mix - 4	クラミドフィラ・ニューモニエ *Chlamydophila pneumoniae*	16S rRNA 遺伝子	なし
Probe/Primer Mix - 5	レジオネラ・ニューモフィラ *Legionella pneumophila*	*mip* 遺伝子＊2	16S rRNA 遺伝子＊2
Probe/Primer Mix - 6	A 群溶血性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes*	16S rRNA 遺伝子＊2	*SLO* 遺伝子＊2

＊1： インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）の検出には、16S rRNA 遺伝子の変異が少ない領域を用いていますが、最近、この領域にも変異が入り始めています。そのためごく稀に、検査材料中にインフルエンザ菌が存在しても、変異体のため陽性を示さない場合があり、注意が必要です。チョコレート寒天培地による培養法での確認を併用することを推奨します。

＊2： 2 種の遺伝子をそれぞれ別の蛍光色素で同時に検出することで、*L. pneumophila* とその他の *Legionella* 属の菌、*S. pyogenes* とその他のβ溶血性レンサ球菌を区別します。

	L. pneumophila	その他の *Legionella* 属
Probe/Primer Mix - 5	FAX、ROX ともに検出	ROX のみ検出

	S. pyogenes	その他のβ溶血性レンサ球菌
Probe/Primer Mix - 6	FAX、ROX ともに検出	ROX のみ検出

（B 群はどちらも検出されません。）

II. 保存

－ 20℃

コンポーネント 1 には酵素が含まれているため、一度融解した後はいくつかのチューブに分注して保存することをお勧めします。
長期保存するのでなければ、融解後は 4℃で保存しておくことも可能です。
開封後は、Positive Control による試薬の汚染を避けるため、コンポーネント 2. ～ 8. とコンポーネント 9. ～ 16. を別々の箱に入れ、それぞれ－ 20℃で保存してください。

III. キット以外に必要な機器、試薬（主なもの）

【 試薬 】

核酸抽出試薬（EXTRAGEN II（東ソー（株））など）

【 器具 】

1. 200 μl、20 μl、10 μl　各マイクロピペット
2. マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）

【 機器 】

リアルタイム PCR 装置＊

Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
コンタミネーション回避のため、チューブ 1 本ごとにフラットキャップが付いているキャップ付き 0.2 ml 8 連チューブをお勧めします。
0.2 ml 8-strip tube、individual Flat caps（製品コード NJ600）

＊：Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Life Technologies 社）をご使用の場合、Baseline がフラットになるように、必要に応じて Auto 設定を解除し、Threshold を Manual で設定していただく必要があります。StepOnePlus、7500 Fast Real-Time PCR System 用のプロトコール（Threshold の設定方法も含む）は、弊社ウェブサイトよりダウンロードしてください。

IV. 操作上の注意

1. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

2. 万一、キメラプローブやプライマーがヌクレアーゼの混入により分解されると、正確な検出が出来ません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、操作には細心の注意を払ってください。

3. 反応液の調製から検出まで、次の 3 つのエリアを設定し、物理的に隔離することを推奨します。各エリアにおいては、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。

   ○ エリア 1：反応液の調製、分注を行います。
   ○ エリア 2：検体の調製を行います。
   ○ エリア 3：検体の反応液への添加と、反応および検出を行います。

   本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。また、コンタミネーション発生の原因となりますので、増幅産物をチューブから取り出すことはおやめください。

V. 操作

V-1. サンプル DNA の調製（エリア 2 で実施）

検体（上咽頭拭いなど）から、EXTRAGEN II（東ソー（株））などを用いて鋳型 DNA を調製してください。

EXTRAGEN II（東ソー（株））を用いた調製方法例

（1）検体スワブを 0.5 ml のブロスに混釈し、5,000 rpm で 5 分間、遠心する。
（2）沈渣 100 μl を、8 μl の試薬 1（共沈剤）を分注した 1.5 ml チューブに加え、ボルテックスにより 10 秒間撹拌後、12,000 rpm で 3 秒間、遠心する。
（3）試薬 2（タンパク質変性剤、2- プロパノール）を 500 μl 加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌する。
（4）12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄する。
（上清を完全に除去するため、再度スピンダウンしてチップで上清を廃棄する。）
（5）試薬 3（塩化カリウム、2- プロパノール）を 200 μl 加え、ボルテックスにより 10 秒間攪拌する。
（6）12,000 rpm で 3 分間遠心後、上清を廃棄する。
（上清を完全に除去するため、再度スピンダウンしてチップで上清を廃棄する。）
（7）RNase free dH_2O 40 μl を氷上で加え、沈殿を溶解し、DNA/RNA 抽出液とする。

注：全工程でフィルター付チップを使用する。
RNase free dH_2O は必ず小分けし、一回で使い切ること。

V-2. 反応液の調製と反応

正しい検出結果を得るために、陽性コントロール反応および陰性コントロール反応を同時に行ってください。

（1）下記に示す反応液を氷上で調製する。（エリア 1 で実施）
6 種類の検出系について、それぞれ反応液を調製する。

サンプル DNA 等の鋳型以外のコンポーネントを必要本数＋α分調製し、各反応チューブに 24 μl 分注して軽くふたをする。その内の 1 本に陰性コントロールとして、滅菌水を 1 μl 加え、しっかりとふたをする。
必要本数は、Probe/Primer Mix - 1 ～ Probe/Primer Mix - 4 はサンプル数＋ 2 本（陰性コントロール反応、陽性コントロール 1 反応）、Probe/Primer Mix - 5、Probe/Primer Mix - 6 はサンプル数＋ 3 本（陰性コントロール反応、陽性コントロール 2 反応）と設定する。

	液量（1 反応）	最終濃度
2 × CycleavePCR Reaction Mixture	12.5 μl	1 ×
Probe/Primer Mixture	2 μl	
（サンプル DNA＊1、2 または Positive Control＊2 または滅菌水）	1 μl	
滅菌水	9.5 μl	
Total	25 μl	

＊1：サンプル DNA は、1 ～ 5 μl の範囲で添加できる。1 μl より多くの量を添加する場合は、最終液量が 25 μl となるように滅菌水の量を調節する。
＊2：サンプル DNA、Positive Control は、ステップ（2）で加えるためここでは加えない。

【注意】蛍光ノイズの原因になりますので、チューブやふたには素手で触れないようご注意ください。

(2) サンプル DNA を添加する。(エリア 3 で実施)
陰性コントロール以外の各チューブに、サンプル DNA または Positive Control*を 1 μl 添加し、しっかりとふたをする。0.2 ml チューブ用の卓上遠心機で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

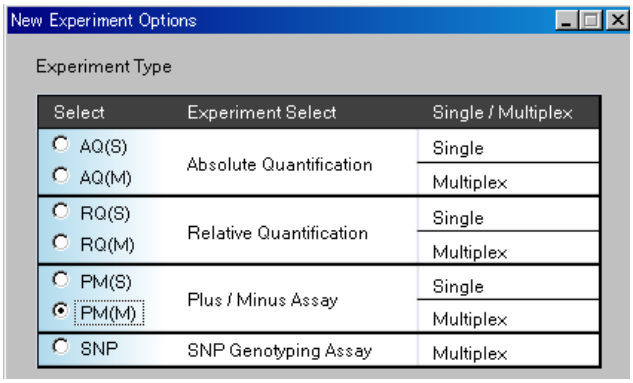
＊：Probe/Primer Mix - 5 および 6 は、それぞれ 2 種類の Positive Control (Positive Control - FAM と Positive Control - ROX) がありますので、陽性コントロール反応は必ず 2 本準備してください。

【注意】反応液調製後、なるべく 1 時間以内に反応を開始してください。

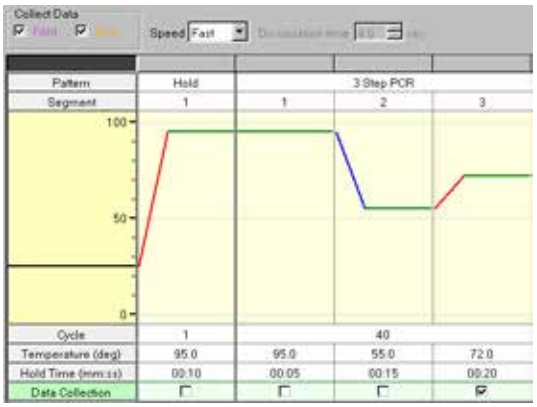
(3) リアルタイム PCR 装置による増幅および検出 (エリア 3 で実施)

【Thermal Cycler Dice Real Time System // の場合】
(Thermal Cycler Dice Real Time System Software)
Thermal Cycler Dice Real Time System // に添付されている説明書をご確認ください。

1. Run File を新規作成し、" New Experiment Options " 画面において Experiment Type ＜ PM(M) Plus/Minus Assay Multiplex ＞を選択する。
食品環境検査用ソフトウェアをご使用の場合は、＜＋／－判定＞を使用します。



2. "Thermal Profile Setup" 画面で PCR 条件を設定する。
Probe/Primer Mix - 5 および Probe/Primer Mix - 6 は、2 つのターゲット遺伝子を FAM と ROX で同時に検出するため、Collect Data の FAM と ROX の両方に☑を入れる。



初期変性 (Hold)
Cycle：1
95℃　10 sec.

3 step PCR (Hold)
Cycle：40
95℃　5 sec.
55℃　15 sec.
72℃　20 sec. (collect data)

3. 画面右下の “Start Run” ボタンをクリックして反応を開始する。

4. “Plate Setup” 画面でサンプル情報を設定する。
   Target & Sample Setting 画面で、Target List、Sample List を作成する。

   4-1. Target List
   Dye　　：Dye of Internal Control は none
   Target List：各 Probe/Primer Mix で検出フィルターとターゲット名を設定する。
   1）Add ボタンをクリックして、必要なだけ Target List に行を追加する。
   （行を削除するには、Delete ボタンをクリックします。）
   2）Dye は必要に応じて変更可能。ドロップダウンメニューから選択する。
   3）Name に Target Name を入力する。
   4）Color は必要に応じて変更する。

   4-2. Sample List：サンプル、NC、各 PC を設定する。
   1）Type のドロップダウンメニューから Type を選択する。
   UNKN（Unknown）　　：測定対象である未知サンプル
   PC（Positive Control）　：陽性コントロール
   NC（Negative Control）　：陰性コントロール
   2）Name に Sample Name を入力する。
   3）Color は必要に応じて変更する。

   4-3. Target List と Sample List の作成が完了したら、画面右下の Update ボタンをクリックする。

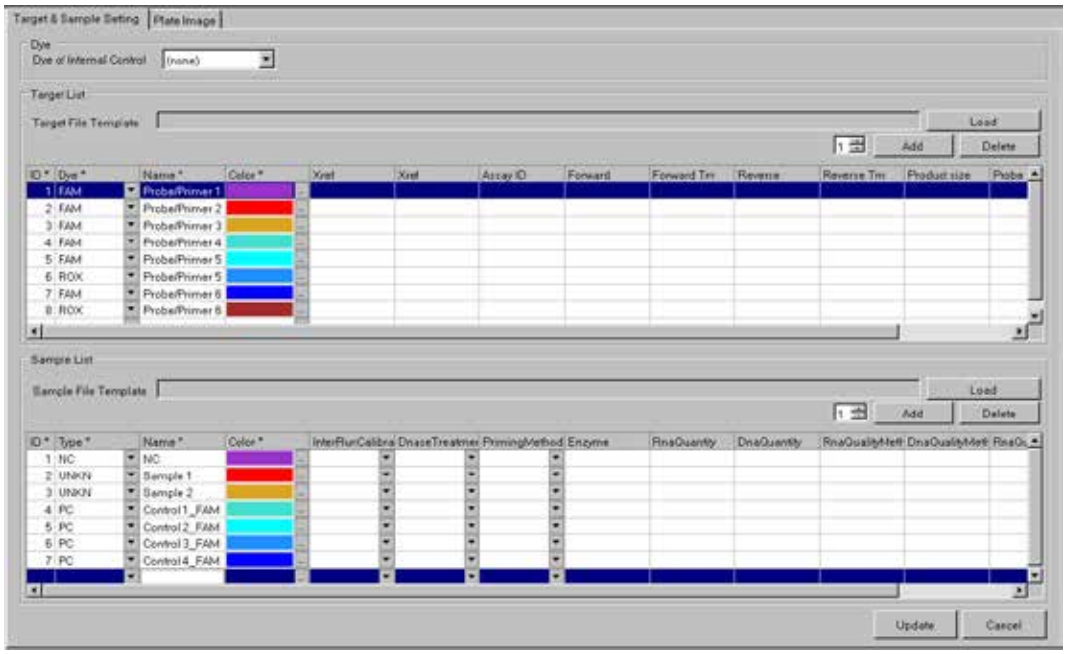
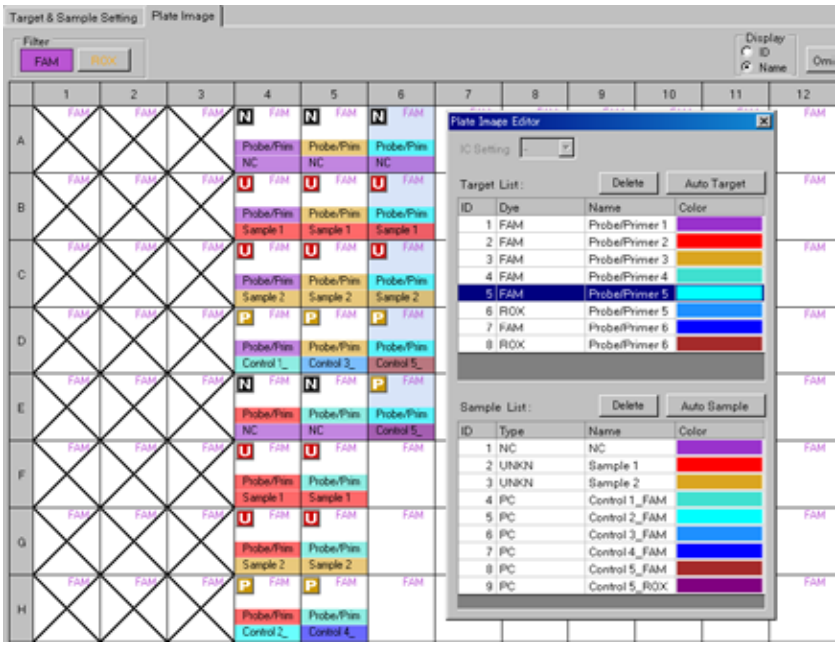


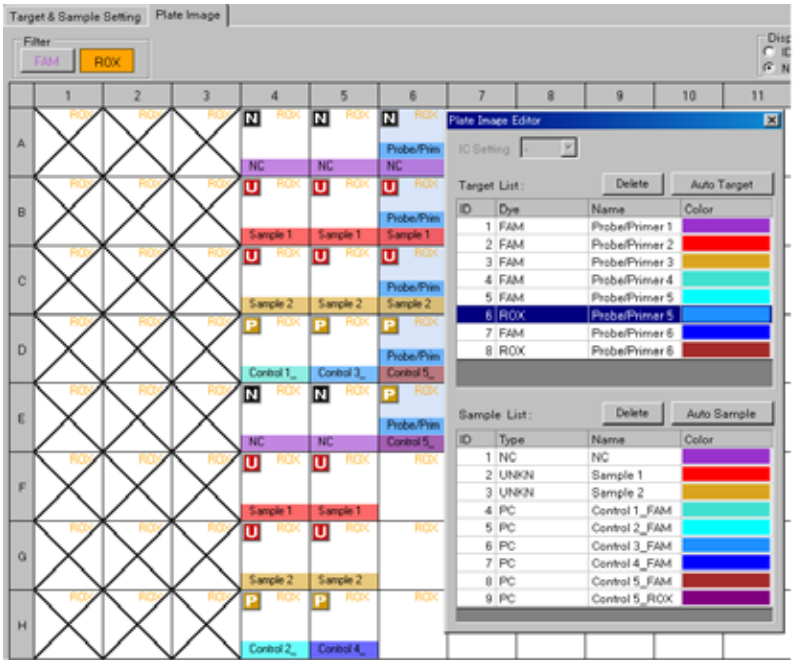
Plate Image の作成

Filter FAM を選択したときは、FAM 検出する Target を設定し、Filter ROX を選択したときは ROX 検出する Target を設定する。

1）Plate Image 上で該当するウェルを選択し、Plate Image Editor で Target を選択する。

2）Plate Image 上で該当するウェルを選択し、Plate Image Editor で Sample を選択する。



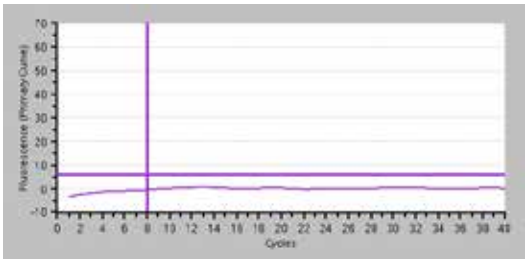


反応に使用しないウェルは Omit 設定する。

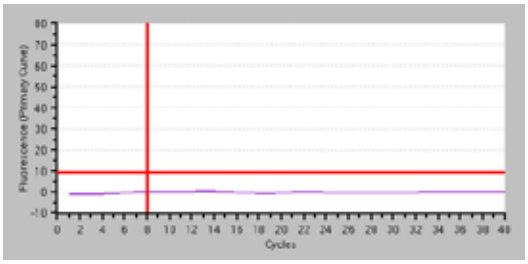
5. 結果解析
反応終了後、“Result/Analysis” ボタンをクリックする。
NC（陰性コントロール）、PC（陽性コントロール）の増幅曲線を確認する。

5-1. NC の増幅曲線の表示：Selector で＜ N ＞を選択

Filter FAM



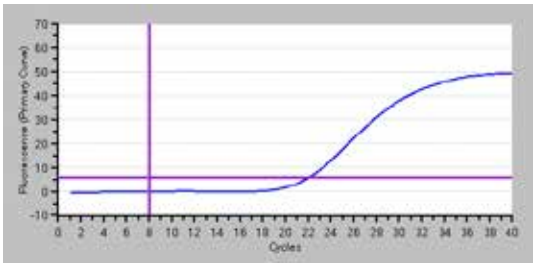
Filter ROX



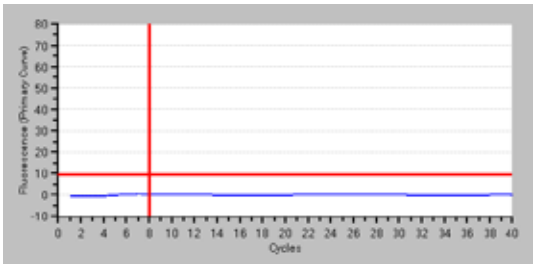
Filter FAM および Filter ROX のいずれにおいても、閾値を超えていないことを確認する。

5-2. PC の増幅曲線の表示：Selector で＜ P ＞を選択
○ Positive Control - FAM を用いた場合

Filter FAM



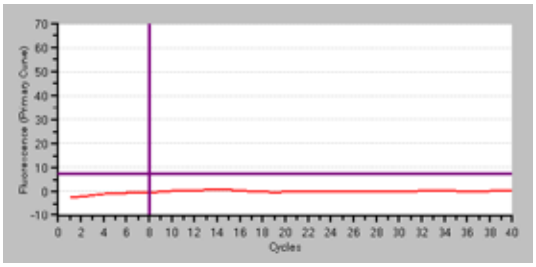
Filter ROX



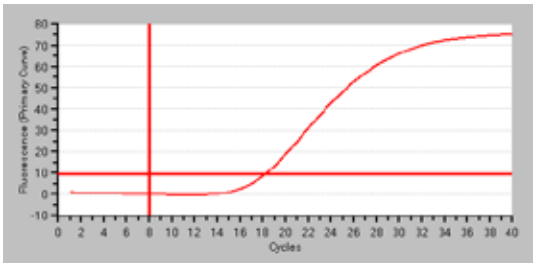
Filter FAM において増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、Filter ROX において閾値を超えていないことを確認する。

○ Positive Control - ROX を用いた場合

Filter FAM



Filter ROX



Filter ROX において増幅曲線が描かれ閾値を超えていること、Filter FAM において閾値を超えていないことを確認する。

5-3. サンプルの増幅曲線は、Selector で＜ U ＞を選択して確認する。

6. 結果の表示
Text の結果表示について説明します。
その他、Plate Format、Scatter Plot で結果表示が可能です。

6-1. Analysis Data ＜ Text Report ＞を選択する。
6-2. Column より表示したい項目に☑を入れる。

Result の表示について

Sample Type が NC、PC
OK　：コントロール反応が正常（反応系に問題がない。）
OUT　：コントロール反応が異常（反応系に問題がある。）
Sample Type が UNKN
Posi.　：ターゲット遺伝子の検出が陽性
Nega.：ターゲット遺伝子が検出限界未満
Error　：同一レプリケート番号の判定が異なる。

結果例）

Filter FAM

Sample Type	Target Name	Sample Name	Filter	Ct(CP)	Ct(SDM)	Detected(F)	P/M Result (F)	Detected(CP)	P/M Result (CP)	Detected(SDM)	P/M Result (SDM)
NC	Mip	NC	FAM	–	–	-	OK	-	OK	-	OK
UNKN	Mip	Mix PC	FAM	34.42	34.35	+	Posi.	+	Posi.	+	Posi.
PC	Mip	Mip PC	FAM	22.07	21.99	+	OK	+	OK	+	OK
PC	Mip	L 16S PC	FAM	–	–	-	OUT	-	OUT	-	OUT

Filter ROX

Sample Type	Target Name	Sample Name	Filter	Ct(CP)	Ct(SDM)	Detected(F)	P/M Result (F)	Detected(CP)	P/M Result (CP)	Detected(SDM)	P/M Result (SDM)
NC	L 16S	NC	ROX	–	–	-	OK	-	OK	-	OK
UNKN	L 16S	Mix PC	ROX	34.72	34.67	+	Posi.	+	Posi.	+	Posi.
PC	L 16S	Mip PC	ROX	–	–	-	OUT	-	OUT	-	OUT
PC	L 16S	L 16S PC	ROX	18.22	17.29	+	OK	+	OK	+	OK

Positive Control 5 - FAM（表中、Sample Name：Mip PC）は、Filter FAM の検出ができ Result が OK となるが、Filter ROX の検出ができないため Result は OUT となる。同様に、Positive Control 5 - ROX（表中、Sample Name：L 16S PC）は、Filter FAM の検出ができないため Result は OUT となるが、Filter ROX の検出ができるため Result が OK となる。

Detected（F）　：Primary Curve Final により求めた Filter ごとのプラスマイナス判定
Detected（CP）　：Primary Curve Ct により求めた Filter ごとのプラスマイナス判定
Detected（SDM）：2nd Derivative Ct により求めた Filter ごとのプラスマイナス判定
P/M Result（F）　：Primary Curve Final により求めた判定結果
P/M Result（CP）　：Primary Curve Ct により求めた判定結果
P/M Result（SDM）：2nd Derivative Ct により求めた判定結果

V-3. 結果表示および判定

各菌種の検出系で、陽性の場合には 40 サイクルのリアルタイム PCR で蛍光シグナルの増幅が認められます＊。

● Thermal Cycler Dice Real Time System の場合、Result/Analysis の表示画面上において、Analysis Data より Text Report を選んだ時、2nd Derivative 法で得られる Ct 値 [Ct（SDM）] に数値が得られている場合、陽性と判断します。検出限界以下の場合には、Ct 値の数値ではなく、“ － ” が表示されます。

なお、結果の判定は、同時に反応・検出を行った陽性コントロールならびに陰性コントロールの結果と合わせて行ってください。

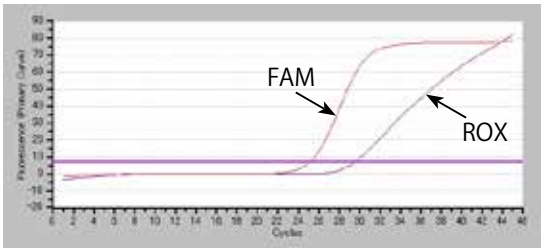
＊：33 サイクル以降で増幅曲線が立ち上がる場合には、電気泳動による目的遺伝子増幅の確認と、再現性を確認するための再反応を行うことをお勧めします。電気泳動を行う際には、PCR 産物のコンタミネーションにご注意ください。

	ターゲット起因菌	ターゲット遺伝子	増幅鎖長	
			サンプル由来	各 Positive Control 由来
Probe/Primer Mix - 1	肺炎球菌 *Streptococcus pneumoniae*	*LytA* 遺伝子	319 bp	205 bp
Probe/Primer Mix - 2	インフルエンザ菌 *Haemophilus influenzae*	16S rRNA 遺伝子	167 bp	110 bp
Probe/Primer Mix - 3	マイコプラズマ・ニューモニエ *Mycoplasma pneumoniae*	16S rRNA 遺伝子	225 bp	185 bp
Probe/Primer Mix - 4	クラミドフィラ・ニューモニエ *Chlamydophila pneumoniae*	16S rRNA 遺伝子	248 bp	165 bp
Probe/Primer Mix - 5	レジオネラ・ニューモフィラ *Legionella pneumophila*	*mip* 遺伝子	168 bp	140 bp
		16S rRNA 遺伝子	387 bp	274 bp
Probe/Primer Mix - 6	A 群溶血性レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes*	16S rRNA 遺伝子	317 bp	230 bp
		SLO 遺伝子	264 bp	187 bp

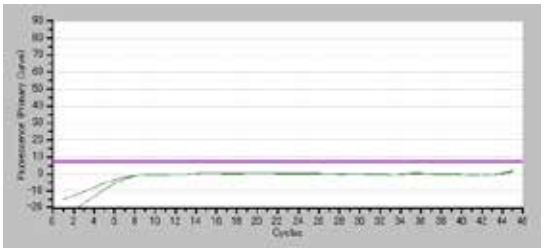
VI. 反応例

Thermal Cycler Dice Real Time System を用いた *S. pyogenes* 検出例

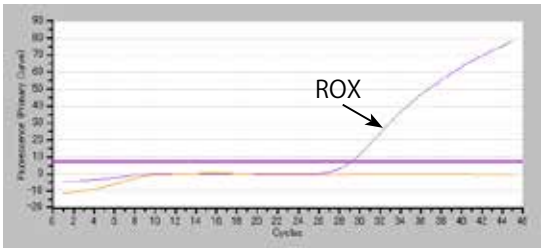
A 群



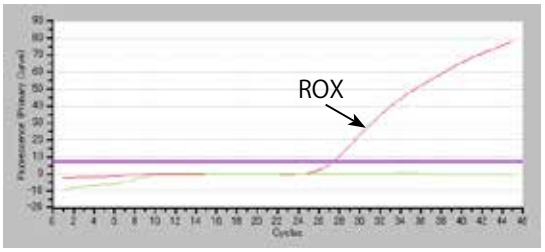
B 群



C 群



G 群



Filter FAM ROX

Well	Sample Name	Sample Type	Target Name	Filter	Ct(CP)	Ct(SDM)
A7	Spyo-NTC	NTC	Spyo 16S	FAM	–	–
A7	Spyo-NTC	NTC	Spyo SLO	ROX	–	–
B7	Spyo-A	UNKN	Spyo 16S	FAM	25.12	25.69
B7	Spyo-A	UNKN	Spyo SLO	ROX	28.88	28.71
C7	Spyo-B	UNKN	Spyo 16S	FAM	–	–
C7	Spyo-B	UNKN	Spyo SLO	ROX	–	–
D7	Spyo-C	UNKN	Spyo 16S	FAM	–	–
D7	Spyo-C	UNKN	Spyo SLO	ROX	28.49	28.43
E7	Spyo-G	UNKN	Spyo 16S	FAM	–	–
E7	Spyo-G	UNKN	Spyo SLO	ROX	26.72	26.50

図 2. 検体 A 群、B 群、C 群、G 群の溶血性レンサ球菌サンプルの増幅曲線と判定

VII. トラブルシューティング

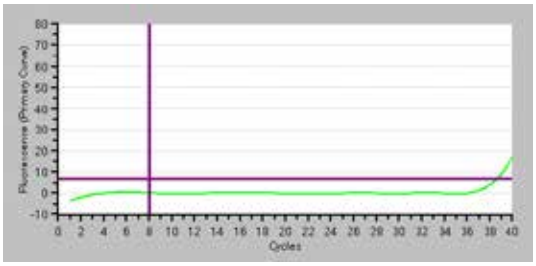
1. シグナルが得られない。

   （1）調製したサンプル中の DNA が検出限界以下である。
   → 必要があれば、サンプルの調製を再度試みる。

   （2）調製したサンプル中に PCR 反応を阻害する物質が含まれている。
   → 陽性であることがわかっているサンプル（Positive Control など）を同時に添加して反応を行い、シグナルが得られない場合は、PCR 反応が阻害されていると考えられる。
   サンプルを再調製、あるいはサンプルを希釈して使用する。

2. Thermal Cycler Dice Real Time System で primary curve でシグナルが得られているが、Ct（SDM）に数値が得られていない。
   → サンプルによっては、Primary curve がきれいにシグモイドカーブにならない場合があり、その場合、Ct（SDM）が算出されない可能性がある。
   陰性コントロールでの増幅曲線と比較を行い、明確にシグナルが確認されていれば陽性と判断する。

3. シグナルが 33 以降に微妙な立ち上がりを示した。



   目的ターゲットと異なる可能性があります。電気泳動にて増幅サイズをご確認ください。

VIII. 参考文献

Morozumi, M., E. Nakayama, S. Iwata, Y. Aoki, K. Hasegawa, R. Kobayashi, N. Chiba, T. Tajima, and K. Ubukata. (2006). Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J. Clin. Microbiol*. **44**:1440-1446.

IX. 関連製品

Cycleave®PCR 呼吸器系感染症起因ウイルス検出キット Ver.2（製品コード CY216）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900/TP960）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700/TP760）
0.2 ml 8-strip tube, individual Flat Caps（製品コード NJ600）

X. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cycleavee、*TaKaRa Ex Taq*、Thermal Cycler Diceはタカラバイオの登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

ご注意
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. のクエンチャーのライセンスを受け、製造・販売されています。
本製品は、生命科学研究分野、食品検査を含む工業的検査分野、環境分析、法医学や動物診断における検出用です。また、これらの分野において、第三者に検出サービスを提供するために、本製品を商業目的で使用することができます。
ヒトの医療、治療、診断や動物の医療、治療、およびバイオテロに関連する分析、患者の処置あるいは治療方法を選択するための用途には使用できません。
本製品は、Epoch Biosciences, Inc. 保有の特許（US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830）のライセンスのもと製造・販売されており、本製品と関連技術に関する権利は、上記特許の及ぶ範囲において Epoch Biosciences, Inc. に属します。下記注にある商業用途のライセンスは包含されていませんので、当該商業目的の使用には、Epoch Biosciences, Inc. からの別途ライセンスが必要です。
（注）別途ライセンスが必要な商業用途には以下の用途を含みます。
A: 本製品、あるいは本製品により派生するものを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。
B: 本製品、あるいは本製品により派生するものの使用権につき、第三者にリース・ライセンス・その他の権利付与をおこなうこと。
C: 本製品を含有するキットを販売・リース・ライセンス・その他の方法で第三者に引き渡すこと。

ライセンスについてお問い合わせ先：
タカラバイオ株式会社
Tel　077-543-6116　Fax　077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

[L4] Quencher
This product is for measurement of amplification detection for research use only in life sciences research, industrial and environmental testing (including food industry, but excluding bio-terrorism and bio-warfare), non-human animal diagnostic testing, forensic testing and providing services to third parties who do not use the services for the purpose of (a) providing patient management or care, and in which the results of such services are not included in patient records and (b) providing bio-terrorism or bio-warfare testing; and specifically excluding, without limitation: (I) any human clinical, therapeutic or diagnostic uses and animal clinical and therapeutic uses (including any use of the results of any testing performed with any product for patient management or care, or the use of the results of the services for patient management or care) and (II) any research or services where the results of any test or assay are used for patient management, care or otherwise in making therapeutic or treatment decisions for a patient.
A portion of this product is subject to proprietary rights of Epoch Biosciences, Inc. and are made and sold under license from Epoch Biosciences, Inc. under the patents and patent applications (US20020155484, WO0142505, WO02099141, US10/113,445, US09/876,830 and corresponding patents issued in other countries).
There is no implied license for commercial use with respect to this product. A license must be obtained directly from Epoch Biosciences, Inc. with respect to any proposed commercial use of this product, and "commercial use" includes but is not limited to (A) the sale, lease, license or other transfer of this product or any material derived or produced from it, (B) the sale, lease, license or other grant of rights to use this product or any material derived or produced from it, and (C) the sale, lease, license or other transfer of kits which include this product.

[M40] Thermostable RNase H
This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 7,422,888 and its foreign counterpart patent claims.

[M46] PCR-Cycleave
This product is covered by the claims of Japanese Patent No. 4022522.

[M57] LA Technology
This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201401Da